冷凍食品の微生物に関する研究

第5報 市販冷凍食品より分離した酵母の性状

(昭和41年11月4日受理)

駒形和男* 中瀬 崇*

Microbiological Studies on Frozen Foods V. General Properties of Yeasts Isolated from Frozen Foods

Kazuo KOMAGATA and Takashi NAKASE

(Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.: 2964, Suzuki-cho, Kawasaki)

The yeast flora isolated from frozen food comprised mainly asporogenous species. They were represented by *Candida* (42%), *Torulopsis* (16%), *Trichosporon* (13%), *Cryptococcus* (11%), *Rhodotorula* (7%), *Debaryomyces* (7%), *Sporobolomyces* (2%) and *Aureobasidium* (2%). Most strains grew well at relatively low temperatures. More than half of the isolates started to grow within a week at -2°C . Strains belonged to the same species had nearly the same maximum growth temperature in spite of their different origins, either frozen food or non-frozen, except for *Trich. cutaneum*. So-called "obligately psychrophilic yeasts" had some common characters such as alcoholic fermentation, starch synthesis and nitrate assimilation, and supposed to be related taxonomically to each other.

(Received November 4, 1966)

緒 言

第1報¹⁾において著者らは冷凍食品のマイクロフローラを構成する主要な微生物は細菌であるが、酵母も比較的多く、分離株の約8%を占めることを報告し、第2報²⁾、第3報³⁾および第4報⁴⁾において分離した細菌の同定について述べた。本報では酵母について報告する。

実 験

I 供試菌株

前報¹⁾に報告した方法により各種冷凍食品より分離した55株の酵母を用いた。

II 同定実験

主として Wickerham⁵⁾, Lodder および Kreger-van Rij⁶⁾ の標準法によった。資化性試験には液体培地を使用し、静置培養にて5週間にわたって生育を観察した。最高生育温度は所定温度で5日間の振とう培養を行なったあとの生育を判定して決定した。集落の色調は“色の標準”⁷⁾に従って記録した。

III ビタミン要求性

試験管に基礎培地 (Table 1) 4 ml を分注して 110° , 15分間殺菌し、別殺菌した供試ビタミンそれぞれ1種を除いたビタミン液 1 ml を無菌的に添加し 30° に数日間無菌試験を行ない試験培地とした。ビタミンの最終濃度は Table 2 に示した。供試菌は YM agar にて前培養を行なったものを基礎培地に懸濁して、 25° にて1夜振とうし、carry over のビタミンを消費させたのちに接

Table 1. Basal Medium for Vitamin Requirement

Glucose	10 g
Vitamin-Free Casamino acids (Difco)	5 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
NaCl	0.1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
Dist. water	1000 ml

pH 5.5

Sterilized at 110°C for 15 min

* 味の素株式会社中央研究所：神奈川県川崎市鈴木町2964

Table 2. Final Concentration of Vitamins
(per 1000 ml)

Biotin	2 µg
Ca-Pantothenate	400 µg
Folic acid	2 µg
Inositol	2000 µg
Niacin	400 µg
p-Aminobenzoic acid	200 µg
Pyridoxine hydrochloride	400 µg
Riboflavin	200 µg
Thiamine	400 µg
Sterilized at 105°C for 5 min (as 5-fold solution)	

種した。観察は2週間にわたって行ない7日目までは毎日観察を行なった。

IV 温度と生育との関係

全分離株について-2°, 4°, 10°, 15°, 17°, 20°, 25°, 30°, 37°および42°における生育を観察した。培地は Yeast Nitrogen Base 6.7 g にグルコース 10 g を

加え加水して 1000 ml としたものを用いた。

生育の観察は別に報告した方法⁹⁾ によった。

結 果

I 分 布

16点の冷凍食品より分離された55株の酵母は8属20種に同定された (Table 3)。ほとんどが無孢子酵母であり、*Candida* が最も多くほぼ半ばを占め (23株)、以下 *Torulopsis* (9株)、*Trichosporon* (7株)、*Cryptococcus* (6株)、*Rhodotorula* (4株)、*Debaryomyces* (4株)、*Sporobolomyces* (1株) および *Aureobasidium* (1株) であった。これらのうち、*D. hansenii*, *Cr. laurentii*, *Cr. albidus*, *T. candida*, *C. zeylanoides*, *C. guilliermondii*, *Trich. cutaneum* および *R. infirmo-miniata* の8菌株は2種類以上の冷凍食品より分離されたが、他の12菌株はそれぞれ1種類の試料から分離されたのみである。酵母がミクロフローラの主要な構成者である“開きイカ”“ワカサギ (B)”¹⁾ においては、それぞれ3種類および5種類の酵母が分離されたが、細菌が主要微生物である試料でも“開きキス”のごとく3種類の酵母が分離されたものもある。

Table 3. Results of Identification and Sources of Isolation

Frozen foods	Number of isolates	Yeasts	Prawn (A)	Octopus (boiled)	Shrimp	Whale meat	"Natto"	Prawn (B)	Calamar (A)	Shrimp-stick (A)	Salmon-stick	Calamar (B)	Shrimp (boiled)	Pond-smelt (A)	Pond-smelt (B)	Oyster breaded	Peach	Crab-stick	Shrimp-stick (B)	Sand-borer	Oyster	Rainbow trout
<i>Sp. roseus</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. hansenii</i>	4		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cr. laurentii</i>	3		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Cr. albidus</i>	2		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cr. luteolus</i>	1		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. candida</i>	9		-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. curiosa</i>	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. punicea</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. salmonicola</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrosa</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>C. curvata</i>	7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	4		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Candida</i> sp.	2		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trich. cutaneum</i>	6		-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Trich. pullulans</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. infirmo-miniata</i>	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. glutinis</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>A. pullulans</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Table 4. Growth of the Isolates at Various Temperatures

Days Temperatures (°C)	7											14										
	-2	4	10	15	17	20	25	30	37	42	-2	4	10	15	17	20	25	30	37	42		
Yeasts																						
<i>Sp. roseus</i> P-56	-*	+	###	###	###	###	###	###	-	-	-	+	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>D. hansenii</i> P-15	+	###	###	###	###	###	###	###	-	-	+	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>Cr. laurentii</i> P-3	+	+	###	###	###	###	###	+	-	-	+	###	###	###	###	###	###	+	-	-	-	
<i>Cr. albidus</i> P-23	+	###	###	###	###	###	###	+	-	-	+	###	###	###	###	###	###	+	-	-	-	
<i>Cr. luteolus</i> P-11	-	+	+	###	###	###	###	+	-	-	+	+	###	###	###	###	###	+	-	-	-	
<i>T. candida</i> P-14	+	###	###	###	###	###	###	+	-	-	+	###	###	###	###	###	###	+	-	-	-	
<i>C. curiosa</i> P-6	###	###	###	###	###	+	-	-	-	-	###	###	###	###	###	+	-	-	-	-	-	
<i>C. punicea</i> P-12	###	###	###	###	###	-	-	-	-	-	###	###	###	###	###	+	-	-	-	-	-	
<i>C. salmonicola</i> P-32	###	###	###	###	###	###	-	-	-	-	###	###	###	###	###	###	-	-	-	-	-	
<i>C. glabrosa</i> P-40	-	-	+	###	###	###	###	###	-	-	+	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>C. lipolytica</i> P-31	+	###	###	###	###	###	###	###	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>C. curvata</i> P-33	-	-	+	###	###	###	###	###	-	-	-	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>C. zeylanoides</i> P-16	+	###	###	###	###	###	###	###	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>C. guilliermondii</i> P-47	+	###	###	###	###	###	###	###	###	###	+	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	
<i>Candida</i> sp. P-4	###	###	###	###	###	###	###	###	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###	###	-	-	
<i>Trich. cutaneum</i> (1) P-25	+	###	###	###	###	###	###	###	-	-	+	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>Trich. cutaneum</i> (2) P-45	-	-	+	+	+	###	###	+	+	-	-	+	+	###	###	###	###	###	###	+	+	
<i>Trich. cutaneum</i> (3) P-53	-	+	+	###	###	###	###	###	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>Trich. pullulans</i> P-1	+	###	###	###	###	###	###	###	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	
<i>R. infirmo-miniata</i> P-2	+	###	###	###	###	###	###	-	-	-	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	-	
<i>R. glutinis</i> P-9	+	###	###	###	###	###	###	+	-	-	###	###	###	###	###	###	###	+	-	-	-	
<i>A. pullulans</i> P-10	+	###	###	###	###	###	###	-	-	-	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	-	

* ###: Good growth ##: Moderate growth +: Rather weak growth -: No growth

Fig. 1. Maximum growth temperatures of the isolates and strains originated in sources other than frozen foods

II 生育と温度の関係

同一菌種に属する菌株は、分離した試料が異なったものでもほぼ同様の傾向を示したので各菌種の代表株の結果のみを示した (Table 4).

分離株は低温においても良好な生育を示すものが多く、 -2° においては、約64%の菌株が1週間以内に生育を開始した。 4° においては約85%の菌株が1週間以内に生育を開始し2週間後には全菌株が生育した。なかでも *C. curiosa*⁹⁾, *C. salmonicola*⁹⁾ および *Candida* sp. (P-4, P-8) の3菌種は低温での生育がとくに良好であり、 -2° においてすら1週間以内に適温に匹敵する菌体量に達した。*C. punicea* は -2° のごとき低温での生育はやや劣るが、その適温は 20° 以下にある。 -2° および 4° での生育がよくない菌株も 10° 以上になれば良好に生育した。

III 最高生育温度

分離菌株および比較に用いた菌株の最高生育温度の範囲を Fig. 1 に示した。分離菌株の約74%は $30\sim 37^{\circ}$ に最高生育温度を有し、 $25\sim 30^{\circ}$ にあるものが11%、 $37\sim$

43° のものが9%であり、 25° 以下の菌株は6%であった。 25° 以下に最高生育温度を有する菌株は *C. curiosa* および *C. punicea* に属し、その適温は前者においては $4\sim 17^{\circ}$ にあり後者においては $15\sim 20^{\circ}$ にあった。冷凍食品より分離された菌株も、冷凍食品以外の試料より分離された菌株も、同一菌種においては、その最高生育温度には顕著な差は認められず *Trich. cutaneum* 以外の菌種においては 4° 以内の差であった。*Trich. cutaneum* においては、その範囲は 10° にも達した。

考 察

20点の冷凍食品中16点より酵母が分離され、分離株の多くは -2° のごとき低温においてすくなく良好な生育を示した。これらの事実より、酵母は冷凍食品に広く分布し、そのマイクロフローラの主要な構成者の一つであると考えられる。また、低温で良好な生育を示す事実は、酵母が冷凍食品の変敗に関与する可能性がありうることを示している。分離された菌株の多くは 30° 以上に最高生育温度を有するいわゆる中温菌であるが、これらの中温菌も低温で生育できるものが多かったことは注目すべ

Table 5. Comparison of Psychrophilic Yeasts

Yeasts	<i>C. scottii</i> ⁶⁾	<i>C. punicea</i> ⁹⁾	<i>C. curiosa</i> ⁹⁾	<i>C. nivalis</i> ¹³⁾	<i>C. gelida</i> ¹³⁾	<i>C. frigida</i> ¹³⁾	<i>C. aquatica</i> ¹⁴⁾
Characters							
Fermentation of sugars							
Glucose	—	—	+	+	+	+	+
Galactose	—	—	—	+*2	+*2	+	—
Saccharose	—	—	+	+	+	+	+
Maltose	—	—	—	—	+*3	—	+*1
Lactose	—	—	—	—	—	—	—
Raffinose	—	—	—	+*3	+*2	+*3	+*1
Assimilation of sugars							
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	—	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	—	—	+	—	+
Lactose	—	—	—	—	—	+	+
Production of "starch"	—	+	+	+	+	+	+
Assimilation of nitrate	+	+	+	+	+	+	+
Liquefaction of gelatin	+	+	+	+ or —	+	—	?
Peptonization of milk	+	+	+	?	?	?	?
Max. growth temperature	$15^{\circ}-?$	23°	22°	$20^{\circ}(?)$	$20^{\circ}(?)$	$20^{\circ}(?)$	25°
Formation of mycelia	Pseudo.	Pseudo.*4 True*4	Pseudo. True	Pseudo.	Pseudo.	Pseudo.*4	Pseudo.
Requirement of vitamins	—	+*5	+*5	+	+	+	+

*1: Weak

*2: May be weak

*3: May be weak or negative

*4: Primitive

*5: Requirement of biotin and thiamine

きである。 *Trich. cutaneum* 以外の菌においては分離源が冷凍食品である与否にかかわらず、同一菌種に属する菌株は、ほぼ同一の最高生育温度を有し、その範囲は4°以内であった。最高生育温度はその棲息する環境等に影響されがたい安定した形質であると考えられ、最高生育温度を分類学的性質として重視する Van Uden⁹⁾~¹¹⁾ の説の妥当性を示すものと思われる。 *Trich. cutaneum* についてはその範囲が10°にも達したが、本菌種においてはビタミン要求性、炭素化合物資化性にもかなりの差が認められ、本菌種は“heterogenous”であると思われる。 *C. curiosa* および *C. punicea* の最適生育温度は20°以下にあり、Stokes¹²⁾ の“obligate psychrophile”の定義に合致する。最近“obligate psychrophile”に相当する酵母として4種の新菌種、すなわち *C. nivalis*¹³⁾、*C. gelida*¹³⁾、*C. frigida*¹³⁾ および *C. aquatica*¹⁴⁾ が記載されたが、これらの酵母は *C. curiosa* をも含めて、互いに共通した性質を有している (Table 5)。なかでも、これらの菌種がいずれも糖の発酵能と“スターチ”生産能をあわせ持ち、唯一の窒素源として硝酸塩を利用することは注目すべきであり、分類学的に近縁の菌種と考えられる。

要 約

1. 冷凍食品より分離した55株の酵母の分類学的研究を行ない、8属20種に同定した。
2. 分離株の約90%が無孢子酵母であり、*Candida* 属がその半数に近かった。
3. 分離株は低温での生育が良好なものが多く、半数以上の菌株が-2°において1週間以内に生育した。
4. 冷凍食品より分離されたか否かにかかわらず、同一菌種に属する菌株はほぼ同一の最高生育温度を示した。
5. “obligate psychrophilic yeasts”は分類学的に

共通の性質を有するものが多く、互いに近縁であることを示した。

本研究にあたり種々ご指導いただいた味の素(株)中央研究所の勝屋 登博士および実験に協力いただいた加藤永恵氏に感謝いたします。

本研究の一部は日本植物学会大会(1964年10月、金沢)で発表。

文 献

- 1) 駒形和男, 小川博望, 勝屋 登: 食衛誌, 5, 441 (1964).
- 2) 駒形和男, 小川博望: 同上 7, 234 (1966).
- 3) 駒形和男, 小川博望: 同上 7, 239 (1966).
- 4) 駒形和男, 小川博望: 同上 7, 248 (1966).
- 5) L. J. Wickerham: “Taxonomy of yeasts” U. S. D. A. Tech. Bull. No. 1029 (1951).
- 6) J. Lodder, N. J. W. Kreger-van Rij: “The yeasts, a taxonomic study”, North Holland Pub. Co., Amsterdam (1952).
- 7) 日本色彩研究所: “色の標準”(1964).
- 8) K. Komagata, T. Nakase: J. Gen. Appl. Microbiol. 11, 255 (1965).
- 9) N. van Uden, M. Farinha: Port. Acta Biol. (B) 6, 161 (1958).
- 10) N. van Uden, L. do Carmo-Sousa: ibid. 6, 239 (1959).
- 11) N. van Uden: “Recent Progress in Microbiology” VIII, Univ. Toront, p. 635 (1962).
- 12) J. L. Stokes: ibid. p. 187 (1962).
- 13) M. E. di Menna: Antonie van Leeuwenhoek 32, 25 (1966).
- 14) E. B. G. Jones, W. Ch. Slooff: ibid. 32, 223 (1966).